

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2003年3月27日 (27.03.2003)

PCT

(10)国際公開番号
WO 03/024446 A1

(51)国際特許分類⁷: A61K 31/4152, A61P 1/16, 3/10, 7/04,
9/00, 43/00, G01N 33/48, C07D 231/26

(74)代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号
京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP02/09087

(22)国際出願日: 2002年9月6日 (06.09.2002)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2001-275466 2001年9月11日 (11.09.2001) JP
特願2001-275467 2001年9月11日 (11.09.2001) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 三菱
ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA
CORPORATION) [JP/JP]; 〒541-0046 大阪府 大阪市
中央区 平野町2丁目6番9号 Osaka (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 山本 順寛 (YA-MAMOTO,Yorihiro) [JP/JP]; 〒167-0031 東京都杉並区 本天沼3-34-38-107 Tokyo (JP). 高橋 千寿子 (TAKAHASHI,Chizuko) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP). 渡邊 和俊 (WATANABE,Kazutoshi) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内 Tokyo (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

—すべての指定国たための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

添付公開書類:

—国際調査報告書
—不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドブック」を参照。

(54)Title: OXIDATION STRESS INHIBITOR AND METHOD OF MEASURING OXIDATION STRESS

(54)発明の名称: 酸化ストレス抑制剤および酸化ストレスの測定方法

WO 03/024446 A1

(57)Abstract: It is intended to provide an oxidation stress inhibitor containing as the active ingredient a pyrazolone derivative represented by the formula (I) as defined in the description or its pharmaceutically acceptable salt; and a method of measuring oxidation stress characterized by using a monounsaturated fatty acid, ubiquinone-10 or cholesterol ester hydroperoxide in the plasma as a marker, a clinical examination method a method of evaluating a drug. The above-mentioned drug is useful as a preventive/a remedy for various oxidation stress diseases (for example, ischemic diseases and various diseases depending thereon, namely, cerebrovascular diseases such as brain infarction and brain attack, brain hypofunction and vascular dementia caused thereby, various brain diseases in association with aging such as cerebrovascular tissue lesion, various peripheral circulatory disorders based on cardiomyopathic ischemia such as cardiomyopathic infarction and heart failure, liver failure, and diabetes). The above-mentioned method of measuring oxidation stress makes it possible to accurately and quantitatively measure oxidation stress, which makes it applicable to clinical examinations and evaluation of drugs.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明によれば、明細書に定義する式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、酸化ストレス抑制剤、並びにマーカーとして血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法、臨床検査方法、及び薬剤の評価方法が提供される。本発明の医薬は、各種の酸化ストレス疾患（例えば、虚血疾患若しくはそれに基づく各種の疾患、即ち、脳梗塞、脳卒中等の脳血管障害、又はそれらに起因する脳機能低下、血管性痴呆、加齢に伴う脳血管組織病変等の諸種脳疾患、心筋梗塞、心不全等心筋虚血に基づく諸種末梢循環障害等、並びに肝障害、糖尿病等）の予防・治療剤として有用である。本発明による酸化ストレスの測定方法によれば、酸化ストレスを的確かつ定量的に測定することができ、臨床検査や薬剤の評価に応用可能である。

明細書

酸化ストレス抑制剤および酸化ストレスの測定方法

技術分野

本発明は、酸化ストレス疾患の治療及び／又は予防のための医薬として有用な酸化ストレス抑制剤に関するものである。さらに詳細には、本発明は、ピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、酸化ストレス抑制剤に関する。さらに本発明は、酸化ストレスの測定方法に関するものである。さらに詳細には、本発明は、マーカーとして血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10（CoQ-10ともいう）又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法に関する。

背景技術

何らかの原因で細胞内あるいは細胞周辺で生体内酸化防御機構にインバランスが生じると、生体膜が酸化されるが、最も酸化されやすいのは膜脂質中の高度不飽和脂肪酸である。高度不飽和脂肪酸の減少を補うために、細胞は脂肪酸不飽和酵素を活性化し、ステアリン酸（18：0）のオレイン酸（18：1）への、パルミチン酸（16：0）のパルミトオレイン酸（16：1）への変化が進行する。さらに酸化ストレスが亢進し、細胞が死に至ると、加水分解酵素が働き、遊離の脂肪酸が血流中に出てくることになるが、その遊離脂肪酸の組成は酸化ストレスがかかっていない場合に比べ、高度不飽和脂肪酸の割合が少なく、モノ不飽和脂肪酸（オレイン酸（18：1）、パルミトオレイン酸（16：1））の割合が多いことが知られている。

細胞中の酸化ストレスの亢進のみならず、血流中でも活性酸素・フリーラジカルの生成が増加すると、最初に減少する抗酸化物質はビタミンCとユビキノール-10である。ユビキノール-10は選択的にユビキノン-10に酸化されるために、これを酸化ストレスの指標とすることは有用である。ビタミンCとユビキ

ノールー 10 が減少した後は、リポタンパク質中のコレステロールエステルの酸化が進行し、その酸化生成物であるコレステロールエステルヒドロペルオキシドの生成が顕著になる。したがって、このヒドロペルオキシドは後期酸化ストレスマーカーとして有用のみならず、この生成を抑制する抗酸化物質は実用上大きな意味を持つ。

酸化ストレスにより誘発または進行、増悪する疾患（以下、「酸化ストレス疾患」と称することもある）としては、肝障害、脳血管障害（脳梗塞、脳出血など）、糖尿病などが挙げられる。現在までの所、血漿中モノ不飽和脂肪酸が上昇する例としては、ラット肝障害モデル（四塩化炭素投与、L E C ラット）、脳血管障害急性期患者、新生児などで報告がある。しかしながら、血漿中モノ不飽和脂肪酸を低下させる作用を有する薬剤に関する報告はない。

また従来から、障害部位での酸化障害は認識されているが、障害部位での酸化障害（例えば、脳梗塞では脳組織が酸化障害を受ける）を的確かつ定量的に実証したという報告はない。動物実験で標的臓器を摘出・抽出し、過酸化脂質を定量するなどの方法は知られているが、組織抽出は臨床の現場で組織（例えば、肝臓や脳など）での酸化障害を評価する場合には、現実的ではない。酸化障害を的確かつ定量的に、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる方法を開発する必要が依然として存在している。

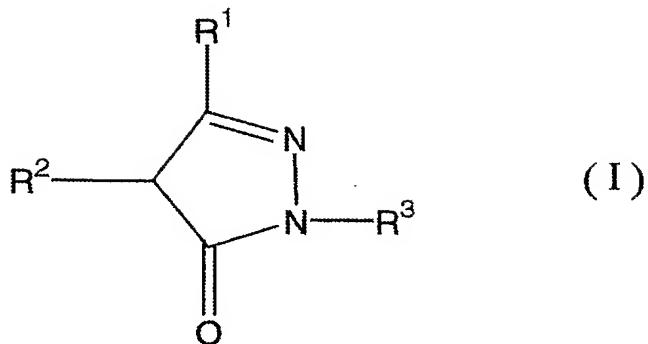
発明の開示

本発明は、副作用の少ない安全な酸化ストレス疾患の治療及び／又は予防のための医薬として有用な酸化ストレス抑制剤を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、酸化ストレスを的確かつ定量的に測定するための新規な方法を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる、新規な酸化ストレスの測定方法を提供することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、本明細書に記載した一定の構造を有するピラゾロン誘導体が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する

方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討し、ラット脳虚血一再開通モデルにおける酸化ストレスマーカー（血漿中モノ不飽和脂肪酸、即ち、オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1））の変化を測定した結果、その濃度の上昇が認められた。また、この酸化ストレスを薬物の投与により抑制できるかどうかを検討した結果、本明細書で定義する下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体を投与した場合に、上述した酸化ストレスマーカーの上昇を抑制できることを見出した。さらに、モノ不飽和脂肪酸の代わりにユビキノン-10の変化を測定した場合も、上記同様の結果が認められた。また、ヒト血漿にラジカル開始剤を添加することにより生成する酸化ストレスマーカー、即ち、コレステロールエステルヒドロペルオキシドの変化を測定した結果、その濃度の上昇が認められた。上記同様、この酸化ストレスを薬物の添加により抑制できるかを検討した結果、下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体がコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を抑制できることを見出した。これらの結果は、式（I）で示されるピラゾロン誘導体が病態時に亢進する酸化ストレスを抑制することを実証するものであると同時に、組織（脳など）の酸化ストレス（酸化障害）を測定するためのマーカーとして、血漿中モノ不飽和脂肪酸（即ち、オレイン酸（18：1）及びパルミトオレイン酸（16：1）、ユビキノン-10及びコレステロールエステルヒドロペルオキシドが有用であることを実証するものである。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、酸化ストレス、好ましくは血漿中のモノ不飽和脂肪酸（即ち、オレイン酸（18：1）及び／又はパルミトオレイン酸（16：1）、ユビキノン-10及び／又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、より好ましくはユビキノン-10及び／又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの抑制剤が提供される。



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

有効成分として、好ましくは、式(I)において、R¹は炭素数1～5のアルキル基であり、R²は水素原子であり、R³は、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置

換基で置換されたフェニル基である。

特に好ましくは、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、酸化ストレス抑制剤が提供される。

本発明の酸化ストレス抑制剤は、好ましくは、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の治療及び／又は予防のための医薬として使用することができる。好ましくは、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患はモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を伴なう疾患であり、より好ましくは、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を伴なう疾患である。本発明の酸化ストレス抑制剤は、血漿中モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくは、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを抑制することにより酸化ストレスを抑制することができる。

本発明の別の側面によれば、薬学的に有効量の前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を、ヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、酸化ストレスを抑制する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、酸化ストレス抑制剤の製造における、前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩の使用が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、マーカーとして血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法が提供される。

好ましくは、モノ不飽和脂肪酸はオレイン酸(18:1)及び／又はパルミトオレイン酸(16:1)である。

好ましくは、モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステ

ルヒドロペルオキシドの測定は液体クロマトグラフィー法によって行う。

本発明の別の側面によれば、被験者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定し、その測定値より酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の病態を分析または評価することを特徴とする臨床検査方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、酸化ストレス抑制作用を有すると予想される薬剤を投与した被験者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定することを含む、当該薬剤が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。

好ましくは、薬剤は、前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩であり、より好ましくは、式(I)において、R¹が炭素数1～5のアルキル基であり、R²が水素原子であり、R³が、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である。式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩として特に好ましくは、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である。

本発明のさらに別の側面によれば、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると予想される患者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定し、その測定値より酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の病態を分析または評価し、その結果、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると判断された患者に対し、前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその

薬学的に許容される塩を投与することを特徴とする、医薬が提供される。式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩として特に好ましくは、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である。

図面の簡単な説明

図1は、血漿中のパルミトオレイン酸(16:1)の割合の経時的変化を示すグラフである。

図2は、血漿中のオレイン酸(18:1)の割合の経時的変化を示すグラフである。

図3は、血漿中のユビキノン-10の割合の経時的変化を示すグラフである。

図4は、血漿中のコレステロールエステルヒドロペルオキシドの割合の経時的変化を示すグラフである。

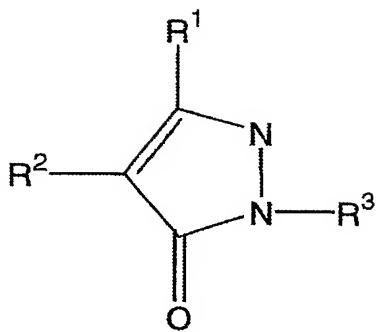
発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

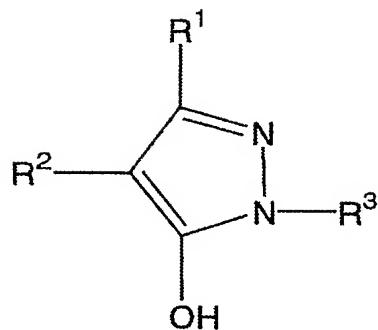
(I) 本発明の医薬

本発明の医薬は、本明細書に定義した式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む。

式(I)で示される化合物は、以下の式(I')又は(I")で示される構造をもとりうる。従って、式(I')又は(I")の構造をとる化合物も本発明の有効成分に含まれる。



(I')



(I'')

式(I)において、R¹の定義におけるアリール基としては、フェニル基並びにメチル基、ブチル基、メトキシ基、ブトキシ基、塩素原子及び水酸基等の置換基で置換されたフェニル基等が挙げられる。

R¹、R²及びR³の定義における炭素数1～5のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基等が挙げられる。

R¹の定義における総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基としては、メトキシカルボニルメチル基、エトキシカルボニルメチル基、プロポキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

R²の定義におけるアリールオキシ基としては、フェノキシ基、p-メチルフェノキシ基、p-メトキシフェノキシ基、p-クロロフェノキシ基、p-ヒドロキシフェノキシ基等が挙げられ、アリールメルカプト基としては、フェニルメルカプト基、p-メチルフェニルメルカプト基、p-メトキシフェニルメルカプト基、p-クロロフェニルメルカプト基、p-ヒドロキシフェニルメルカプト基等が挙げられる。

R²及びR³の定義における炭素数1～3のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。R³の定義における炭素数5～7のシクロアルキル基としては、シクロペ

ンチル基、シクロヘキシリ基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

R^3 の定義において、フェニル基の置換基における炭素数1～5のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロボキシ基、イソプロボキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロボキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基等が挙げられ、炭素数1～3のアルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト基、エチルメルカプト基、プロピルメルカプト基等が挙げられ、炭素数1～4のアルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等が挙げられ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等が挙げられる。

本発明で用いる式(I)の化合物の具体例としては、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(2-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(3-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(3, 4-ジメチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-エチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1-(4-プロピルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(4-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(2-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1-(3-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-メトキシフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3, 4-ジメトキシフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-エトキシフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

3-メチル-1 - (4-プロボキシフェニル) -2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ブロキシフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (2-クロロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3-クロロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-クロロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3, 4-ジクロロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ブロモフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-フルオロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3-クロロ-4-メチルフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3-メチルメルカプトフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-メチルメルカプトフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

4 - (3-メチル-5-オキソ-2-ピラゾリン-1-イル) 安息香酸

1 - (4-エトキシカルボニルフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ニトロフェニル) -3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

3-エチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1-フェニル-3-プロピル-2-ピラゾリン-5-オン

1, 3-ジフェニル-2-ピラゾリン-5-オン

3-フェニル-1 - (p-トリル) -2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-メトキシフェニル) -3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-クロロフェニル) - 3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 3, 4-ジメチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 4-イソブチル-3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 4 - (2-ヒドロキシエチル) - 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン
 - 5-オン
 3-メチル-4-フェノキシ-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 3-メチル-4-フェニルメルカプト-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-
 オン
 3, 3', 4, 5, 6, 7-ヘキサヒドロ-2-フェニル-2H-インダゾール
 - 3-オン
 3 - (エトキシカルボニルメチル) - 1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オ
 ン
 1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1, 3-ジメチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1-エチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1-ブチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (2-ヒドロキエチル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1-シクロヘキシル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1-ベンジル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (α -ナフチル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1-メチル-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン
 3-メチル-1 - (4-メチルフェニル) - 2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (4-ブチルフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (4-メトキシフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (4-ブトキシフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
 1 - (4-クロロフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3, 4-ジヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (2-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (3, 4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ヒドロキシメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-アミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-メチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-エチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ブチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-ジメチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (アセトアミドフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

1 - (4-シアノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

本発明の医薬の有効成分としては、式(I)で表される遊離形態の化合物のほか、生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、臭化水素塩、リン酸等の鉱酸との塩；メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、酢酸、グリコール酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、アスコルビン酸、クエン酸、サリチル酸、ニコチン酸、酒石酸等の有機酸との塩；ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩；マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属との塩；アンモニア、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、N,N-ビス(ヒドロキシエチル)ピペラ

ジン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、エタノールアミン、N-メチルグルタミン、L-グルタミン等のアミンとの塩が挙げられる。また、グリシンなどのアミノ酸との塩を用いてもよい。

本発明の医薬の有効成分としては、上記式（I）で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の水和物、又は上記式（I）で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の溶媒和物を用いてもよい。溶媒和物を形成する有機溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、エーテル、ジオキサン、テトラヒドロフランなどを例示することができる。また、上記式（I）で表される化合物は、置換基の種類により1以上の不斉炭素を有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。本発明の医薬の有効成分としては、純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを用いてもよい。

なお、本発明で用いる式（I）の化合物は公知化合物であり、例えば、特公平5-31523号公報、特公平5-35128号公報などに記載されている。

本発明で有効成分として用いる式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩は、血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを抑制することにより酸化ストレスを抑制することができ、酸化ストレス疾患の治療及び／又は予防のための医薬として使用することができる。従って、本明細書で言う酸化ストレス疾患としては、モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を伴なう疾患が好ましい。酸化ストレス疾患の具体例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

虚血疾患若しくはそれに基づく各種の疾患、即ち、脳梗塞、脳卒中等の脳血管障害、又はそれらに起因する脳機能低下、血管性痴呆、加齢に伴う脳血管組織病変等の諸種脳疾患、心筋梗塞、心不全等心筋虚血に基づく諸種末梢循環障害等；

その他の酸化ストレス疾患としては、アルコール性肝炎、網膜症、網膜鉄錆症、白内障、放射線治療による副作用障害、脳浮腫、抗原毒素によるエンドトキシン・

ショック、腎炎、糖尿病等が挙げられる。

本発明で用いる式（I）の化合物の投与量は一般に非経口投与で 0.01～100mg/kg・日、好ましくは 0.1～10mg/kg・日であり、経口投与で 1～200mg/kg・日、好ましくは 5～20mg/kg・日である。上記投与量は 1 日 1～3 回で投与するのが好ましい。また、上記投与量は、年齢、病態、症状により適宜増減することが更に好ましい。

本発明の医薬としては、上記式（I）で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と薬理学的及び製剤学的に許容される添加物を含む医薬組成物を調製して投与することが好ましい。

薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH 調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。

経口投与に適する医薬組成物には、添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

注射あるいは点滴用に適する医薬組成物には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等の pH 調節剤等の添加物を用

いることができる。

本発明の医薬の形態は特に限定されず、当業者に利用可能な種々の形態をとることができ。経口投与に適する医薬として、例えば、固体の製剤用添加物を用いて錠剤、散剤、顆粒剤、硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、又はトローチ剤などを調製することができ、液状の製剤用添加物を用いてシロップ剤、乳剤、軟ゼラチンカプセル剤などを調製することができる。また、非経口投与に適する医薬として、注射剤、点滴剤、吸入剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを調製することができる。なお、上記の式(I)の化合物を有効成分とする脳保護剤(点滴剤)が、すでに臨床において使用されているので(一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット」:三菱ウェルファーマ株式会社製造・販売)、本発明の医薬において上記市販製剤をそのまま用いることができる。

(II) 本発明による酸化ストレスの測定方法

本発明においては、オレイン酸(18:1)及びパルミトオレイン酸(16:1)などのモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドをマーカー(指標)として、酸化ストレスの測定を行う。なお、本明細書で言うコレステロールエステルヒドロペルオキシドとは、主として、コレステロールの脂肪酸エステルの脂肪酸部分の過酸化体を意味する。本発明においては、対象となる生体から血漿を採取し、その血漿中に存在するオレイン酸(18:1)及びパルミトオレイン酸(16:1)などのモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを、公知の各種の測定手法にて測定する。

オレイン酸(18:1)及びパルミトオレイン酸(16:1)などのモノ不饱和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの量の測定は、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)などの液体クロマトグラフィ法で行うことが好ましい。

高速液体クロマトグラフィによるモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの量の測定は常法に従って行うことができ、カラムとしては、例えばモノ不飽和脂肪酸の測定の場合には、オクチルカラム ($3\ \mu\text{m}$ 、 $3.3\text{cm} \times 4.6\text{mm}\text{ i. d.}$ 、Supelco) + pkb-100 カラム ($5\ \mu\text{m}$ 、 $25\text{cm} \times 4.6\text{mm}\text{ i. d.}$ 、Supelco) などを使用でき、移動相としては、例えば、アセトニトリル/メタノール/水= $17.5/65.0/17.5\text{ (v/v/v)}$ を用いることができる。流速は例えば、 1.5 ml/min とし、カラム温度は 40°C に設定することができる。また、ユビキノン-10の場合には、カラムとしてガードカラム2本 (Type Supelguard LC-ABZ、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $50 \times 4.6\text{mm}\text{ i. d.}$ 、Supelco) + 分析カラム (Type Supelcosil LC-8、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $250 \times 4.6\text{mm}\text{ i. d.}$ 、Supelco) + 還元カラム (Type RC-10-1、Irica) などを使用でき、移動相としては、例えば、メタノール/tert-ブチルアルコール= $85/15\text{ (v/v)}$ (50 mM 過塩素酸ナトリウムを含む) を用いることができ、流速： 0.8 ml/min とすることができる。さらに、コレステロールエステルヒドロペルオキシドの場合には、分析カラムとして (Type Beckman LC-8、 $5\ \mu\text{m}$ 、 $250 \times 4.6\text{mm}\text{ i. d.}$) などを使用でき、移動相としては、例えば、メタノール/tert-ブチルアルコール= $19/1\text{ (v/v)}$ を用いることができ、移動相の流速： 1.0 ml/min 、化学発光剤の流速： 1.5 ml/min とし、化学発光法を用いた高速液体クロマトグラフィにより測定することができる。但し、これらは高速液体クロマトグラフィの一例を示すものにすぎず、当業者であれば好適な条件を適宜設定することができる。

本発明においてモノ不飽和脂肪酸を測定する場合は、好ましくは、総遊離脂肪酸に対するパルミトオレイン酸の割合 (%16:1)、並びに総遊離脂肪酸に対するオレイン酸の割合 (%18:1) を測定する。

上述した方法により得られるオレイン酸 (18:1) 及びパルミトオレイン酸 (16:1) などのモノ不飽和脂肪酸、並びにユビキノン-10及びコレステロールエステルヒドロペルオキシドの量は、生体内において生成する活性酸素又はフリーラジカルの存在量を反映するものであり、従って酸化ストレスの状態を反

映するものである。従って、その測定値の大小により、酸化ストレスの大小の状態を把握することができる。また、その測定値から、酸化ストレス疾患の状態を効果的に分析または評価することが可能である。

酸化ストレス疾患としては、モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を伴なう疾患が好ましく、その具体例としては、本明細書中上記した通りであるが、それらに限定されるものではない。

本発明では、マーカーとして用いるモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10及びコレステロールエステルヒドロペルオキシドは、血漿中に比較的高い割合で存在することから、通常の臨床検査において採用されるHPLC技術等を利用して、容易に実施することができる。

さらに、本発明によれば、酸化ストレス抑制作用を有すると予想される薬剤を投与した被験者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定することを含む、当該薬剤が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。好ましくは、薬剤は、前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩であり、より好ましくは、式(I)において、R¹が炭素数1～5のアルキル基であり、R²が水素原子であり、R³が、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である。式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩として特に好ましくは、3-メチル-1-フェニル-2-

—ピラゾリン—5—オン又はその薬学的に許容される塩である。

さらに本発明によれば、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると予想される患者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン—10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシド、好ましくはユビキノン—10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定し、その測定値より酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の病態を分析または評価し、その結果、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると判断された患者に対し、前記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を投与することを特徴とする、医薬が提供される。式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩として特に好ましくは、3—メチル—1—フェニル—2—ピラゾリン—5—オン又はその薬学的に許容される塩である。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

合成例：3—メチル—1—フェニル—2—ピラゾリン—5—オン（以下、エダラボンと称す）の合成

エタノール50m1中にアセト酢酸エチル13.0g及びフェニルヒドラジン10.8gを加え、3時間還流攪拌した。反応液を放冷後、析出した結晶をろ取り、エタノールより再結晶して、表題の化合物11.3gを無色結晶として得た。

収率 67%

融点 127.5～128.5°C

実施例1：

(方法)

1. 使用動物

7週齢の Crj:CD (SD) 雄性ラット（入荷時体重：197.8～228.8g、日本チャールズ・リバー株式会社）を 50 匹購入し、5 日間以上の検疫馴化期間に一般状態の観察及び体重測定を行い、異常がなく順調な体重推移を示すことを確認した後、8 週齢で試験に供した。すべての動物は、温度 24±2°C、湿度 55±10%、換気回数 13 回/時及び照明 12 時間（午前 7 時～午後 7 時）に設定した飼育室内で飼育した。

2. 試験群の構成

体重差による脳梗塞巣形成のバラツキを防ぐため、手術日の体重を元に層別連続無作為化法で群分けし、生理食塩液投与（対照群及び偽手術（sham ope）群）、被験物質投与（単回投与群及び反復投与群）の計 4 群を設定した。

3. MCA（中大脳動脈）閉塞再開通モデルの作製

ラットを 3% イソフルラン吸入にて麻酔導入後、仰臥位に固定し、2% イソフルラン吸入にて麻酔を維持した。フリームービングの状態で持続注入を行うためにカテーテルを大腿静脈内に留置した。

頸部正中皮膚切開を行い、右側総頸動脈、外頸動脈及び内頸動脈を露出し、総頸動脈及び外頸動脈を縫合糸（5 号）で結紮した。予めシリコンコーティング（キサントプレン L、バイエル薬品）をし 19mm の長さに切断した 4 号のナイロン糸（栓子）を、外頸動脈と内頸動脈の分岐部より挿入し、MCA を閉塞した。MCA 閉塞 2 時間後に栓子を抜き、MCA の血流を再開通させた。MCA 閉塞 30 分後に神経症状（前肢の屈曲）を観察し、前肢の屈曲が確認できない動物は試験から除外した。偽手術群については、本法に準拠して右側総頸動脈及び外頸動脈の結紮まで実施した。手術中の体温調節を行うために体温計用プローブ（PHYSITEMP INSTRUMENTS Inc. BAT-12）を直腸内に挿入しておき、手術前後の体温を記録した。体温低下が見られた場合、白熱灯を用いて体温を 37°C 付近に維持した。

4. 薬物の投与

MCA 閉塞再開通直後 3mg/kg の 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オノンを 1.0mL/body/h の容量で 30 分間の持続注入（1 回目投与）を行い、6 時間後同容量で再度 30 分間の持続注入（2 回目投与）を行った。手術翌日より、午前

10時及び午後16時にインフュージョンポンプ (KD SCIENTIFIC, 10連 infusion pump 230) を用いて3mg/kgの3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを1.0mL/body/hの容量で1日2回30分間の持続注入を連續13日間行った。投与液の濃度は最新の体重をもとに算出した。なお、単回投与群は、手術日の1回目のみ3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与し、2回目以降は同容量の生理食塩液を投与した。対照群及び偽手術群には生理食塩液を同容量で投与した。

5. 採血

MCA閉塞前、閉塞再開通後、1, 2, 3, 5, 7および10日目の1回目の投与開始前及び14日目の午前10時よりヘパリン処理した1mLシリソジを用いて鎖骨下静脈から血液を約0.3mL採取し、3000rpm、10分間遠心して血漿を分離した。血漿は4本のマイクロチューブに25μLずつ分注し、液体窒素で凍結させた後、送付時まで約-80°Cにて凍結保存した。

6. 遊離脂肪酸の分離定量

12.5μMのマルガリン酸(13:0、内部標準)を含む200μlのメタノールを、50μlの血漿に加えよく混和した後、遠心分離した(12,000rpm、3分)。上清50μlの溶媒を窒素気流下で除去後、2mg/m1のモノダンシルカダベリンのジメチルホルムアミド溶液50μlと1μlのシアノリン酸ジエチルを加え、20分間暗所で反応させて、遊離脂肪酸を蛍光誘導化した。

高速液体クロマトグラフィに反応液5μlを注入し、総脂肪酸量と脂肪酸組成を調べた。高速液体クロマトグラフィの条件は以下のとおりである。

カラム：オクチルカラム(3μm、3.3cm×4.6mm i.d.、Supelco) + pkb-100カラム(5μm、25cm×4.6mm i.d.、Supelco)

移動相：アセトニトリル/メタノール/水=17.5/65.0/17.5(v/v/v)

流速：1.5mL /分

カラム温度：40°C

蛍光検出器励起波長：320nm

蛍光検出器蛍光波長：520nm

(結果・考察)

結果を図1及び図2に示す。

図1は、血漿中のパルミトオレイン酸（16：1）の割合の経時的変化を示すグラフである。総遊離脂肪酸に対するパルミトオレイン酸（16：1）の割合を%16：1と定義する。図1において、第0日目における%16：1の値を基準として、変化の百分率（%）をグラフの縦軸に示し、日数をグラフの横軸に示す。

図2は、血漿中のオレイン酸（18：1）の割合の経時的変化を示すグラフである。総遊離脂肪酸に対するオレイン酸の割合を%18：1と定義する。第0日目における%18：1の値を基準として、変化の百分率（%）をグラフの縦軸に示し、日数をグラフの横軸に示す。

偽手術群のラットでは、パルミトオレイン酸（16：1）及びオレイン酸（18：1）の割合に大きな変動は見られなかった。しかし、対照群のラットでは、MCA閉塞一再開通後1～5日後までパルミトオレイン酸（16：1）及びオレイン酸（18：1）の割合が有意に上昇し、この間の酸化ストレス亢進が示唆された。一方、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与した群では、パルミトオレイン酸（16：1）及びオレイン酸（18：1）の割合は、偽手術群と同じようにほとんど変化せず、対照群と比較して有意に抑制された。

上記の結果は、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンが脳虚血一再開通後に増加するラジカルを有効に消去し、脂質過酸化反応を抑制することにより脳を保護することを示唆する。

実施例2：ユビキノン-10（CoQ-10）の分離定量

(方法)

使用動物、試験群の構成、MCA閉塞再開通モデルの作製、薬物の投与、及び採血は実施例1と同様に行った。ユビキノン-10（CoQ-10）の分離定量は

以下の通り行った。

250 μl の cold メタノールと 500 μl の cold ヘキサンを、50 μl の血漿に加えよく混和した後、遠心分離した (10,000g、3 分間、4°C)。5 μl のヘキサン層 (0.5 μl の血漿に相当) を速やかに高速液体クロマトグラフィに注入し、ユビキノン-10 (CoQ-10) 量を調べた。高速液体クロマトグラフィの条件は以下の通りである。

カラム：ガードカラム 2 本 (Type Supelguard LC-ABZ、5 μm、50 × 4.6 mm i. d.、Supelco) + 分析カラム (Type Supelcosil LC-8、5 μm、250 × 4.6 mm i. d.、Supelco) + 還元カラム (Type RC-10-1、Irica)

移動層：メタノール / *tert*-ブチルアルコール = 85 / 15 (v / v) (50 mM 過塩素酸ナトリウムを含む)

流速：0.8 ml / 分

検出：電気化学検出器作用電圧：+600 mV

(結果)

結果を図 3 に示す。

図 3 は、血漿中のユビキノン-10 の割合の経時的变化を示すグラフである。

図 3において、第 0 日目におけるユビキノン-10 の値を基準として、変化の百分率 (%) をグラフの縦軸に示し、日数をグラフの横軸に示す。

偽手術群のラットでは、ユビキノン-10 の割合に大きな変動は見られなかつた。しかし、対照群のラットでは、MCA 閉塞 - 再開通後ユビキノン-10 の割合が上昇し、この間の酸化ストレス亢進が示唆された。一方、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを投与した群では、ユビキノン-10 の割合は、偽手術群と同じようにほとんど変化しなかつた。なお、偽手術群の 2 例及び反復投与群 1 例を除く全例において 5 日目のユビキノン-10 の測定ではユビキノン-10 が検出されなかつたことから、図 3においては 5 日目のデータは削除した。

実施例 3 : コレステロールエステルヒドロペルオキシド (CE-OOH) の測定

(方法)

健康な 40 才代男性から提供された血液から、実施例 1 に述べた方法に準じて、血漿を分離した。この血漿 2 mL にラジカル開始剤である 2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレニトリル) (AMVN) (和光純薬社より購入) を AMVN 濃度が 10 mM となるように加えた。エダラボン投与群にはエダラボン濃度が 50 μM となるように、さらにエダラボンを加えた。

反応混液を 37 °C に保ち、4、5 及び 6 時間後に反応混液中に含まれるコレステロールエステルヒドロペルオキシド量をイソルミノール化学発光法を用いた高速液体クロマトグラフィーにより測定した。測定条件は以下の通り。

化学発光剤の調製

177. 2 mg のイソルミノール (シグマ社より購入) と 5 mg のマイクロパーオキシダーゼ (シグマ社より購入) を 500 mL のメタノールと 500 mL のホウ酸塩緩衝液 (pH 10) の混合液中に溶解し、化学発光剤を調製した。

流速

移動相 (メタノール / t-ブタノール = 19 / 1 (v/v)) : 1.0 mL / 分

化学発光剤 : 1.5 mL / 分

カラム

分析カラム : Type Beckman LC-8, 5 μm, 250 × 4.6 mm i.d.

(結果)

結果を図 4 に示す。

図 4 は、反応混液中に含まれるコレステロールエステルヒドロペルオキシド濃度の経時的変化を示すグラフである。図 4において、コレステロールエステルヒドロペルオキシド濃度をグラフの縦軸に示し、経過時間をグラフの横軸に示す。5 時間経過後以降において、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-

オン（薬剤）を添加した群では、コレステロールエステルヒドロペルオキシド濃度の増加が抑制された。

産業上の利用の可能性

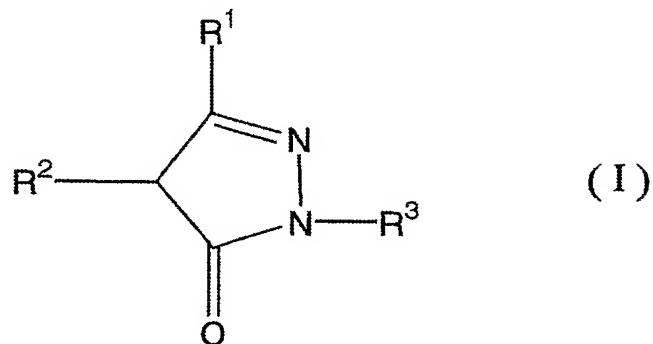
本発明の医薬は、各種の酸化ストレス疾患（例えば、虚血疾患若しくはそれに基づく各種の疾患、即ち、脳梗塞、脳卒中等の脳血管障害、又はそれらに起因する脳機能低下、血管性痴呆、加齢に伴う脳血管組織病変等の諸種脳疾患、心筋梗塞、心不全等心筋虚血に基づく諸種末梢循環障害等、並びに肝障害、糖尿病等の予防・治療剤として有用である。

さらに本発明により、酸化ストレスを的確かつ定量的に測定するための新規な方法が提供される。本発明の方法は、組織を侵襲することなく血液などを標品として測定できる。さらに、本発明によれば、血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量をマーカーとすることにより、本明細書に記載した一定の構造を有するピラゾロン誘導体が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法が提供される。本発明の方法によれば、当該ピラゾロン誘導体の薬剤としての有効性を的確かつ簡単に評価することができる。

本出願が主張する優先権の基礎となる出願である特願2001-275466及び特願2001-275467の明細書に記載の内容は全て、本明細書の開示の一部として本明細書中に引用により取り込むものとする。

請求の範囲

1. 下記式（I）で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、酸化ストレス抑制剤。



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

2. 式（I）において、R¹が炭素数1～5のアルキル基であり、R²が水素原子であり、R³が、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル

基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である、請求項1に記載の酸化ストレス抑制剤。

3. 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、請求項1または2に記載の酸化ストレス抑制剤。

4. 酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の治療及び／又は予防のための医薬として使用する、請求項1から3の何れかに記載の酸化ストレス抑制剤。

5. 酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患が、モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を伴なう疾患である、請求項4に記載の酸化ストレス抑制剤。

6. 血漿中モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを抑制することにより酸化ストレスを抑制する、請求項1から5の何れかに記載の酸化ストレス抑制剤。

7. マーカーとして血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドを用いることを特徴とする酸化ストレスの測定方法。

8. モノ不飽和脂肪酸がオレイン酸(18:1)及び／又はパルミトオレイン酸(16:1)である、請求項7に記載の酸化ストレスの測定方法。

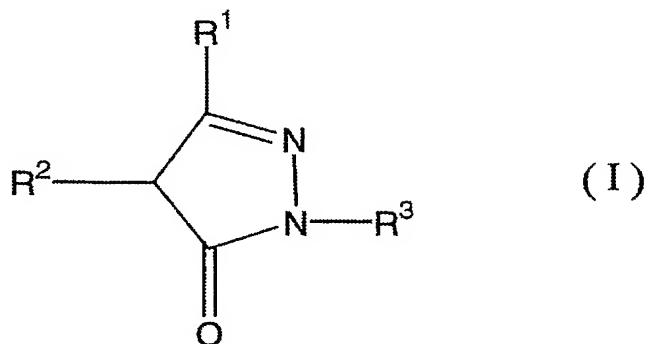
9. モノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの測定を液体クロマトグラフィー法によって行う、請求項7又は8に記載の酸化ストレスの測定方法。

10. 被験者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定し、その測定値より酸化スト

レスにより誘発、進行又は増悪する疾患の病態を分析または評価することを特徴とする臨床検査方法。

11. 酸化ストレス抑制作用を有すると予想される薬剤を投与した被験者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定することを含む、当該薬剤が有する酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法。

12. 薬剤が、下記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩である、請求項11に記載の方法。



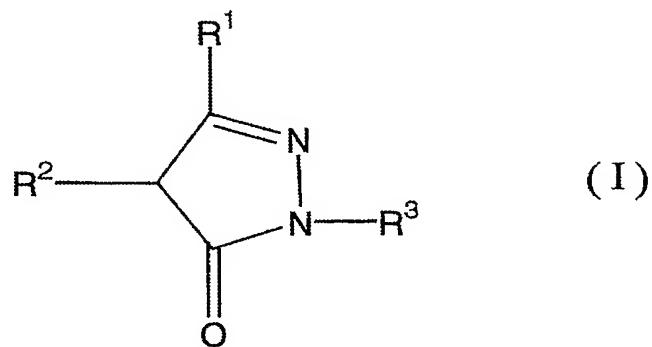
(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基

で置換されたフェニル基を表す。)

13. 式(I)において、R¹が炭素数1～5のアルキル基であり、R²が水素原子であり、R³が、炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基である、請求項12に記載の方法。

14. 式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である、請求項12又は13に記載の方法。

15. 酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると予想される患者の血漿中のモノ不飽和脂肪酸、ユビキノン-10又はコレステロールエステルヒドロペルオキシドの含有量を測定し、その測定値より酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患の病態を分析または評価し、その結果、酸化ストレスにより誘発、進行又は増悪する疾患を患っていると判断された患者に対し、下記式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩を投与することを特徴とする、医薬。



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素

数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表わし；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表わし；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基又は非置換の、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

16. 式(I)で示されるピラゾロン誘導体又はその薬学的に許容される塩が、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン又はその薬学的に許容される塩である、請求項15に記載の医薬。

図 1

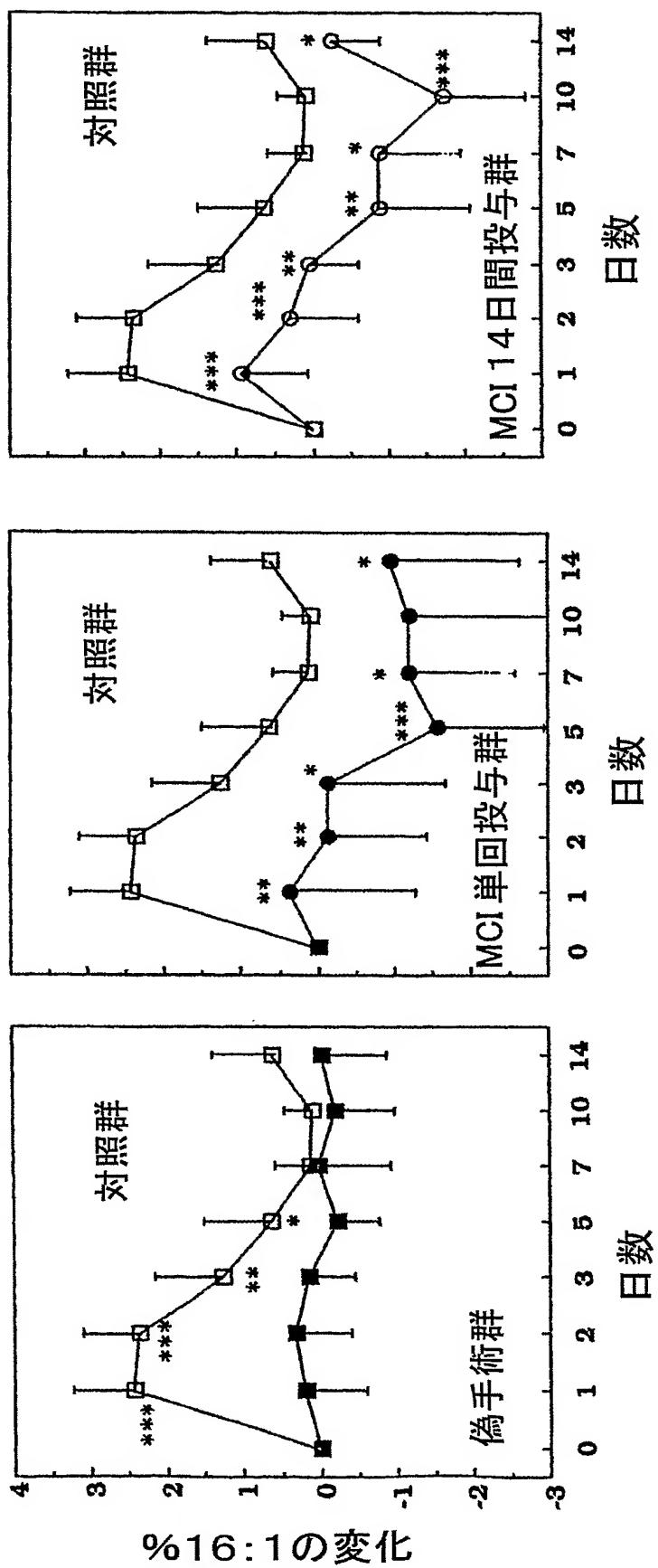


図 2

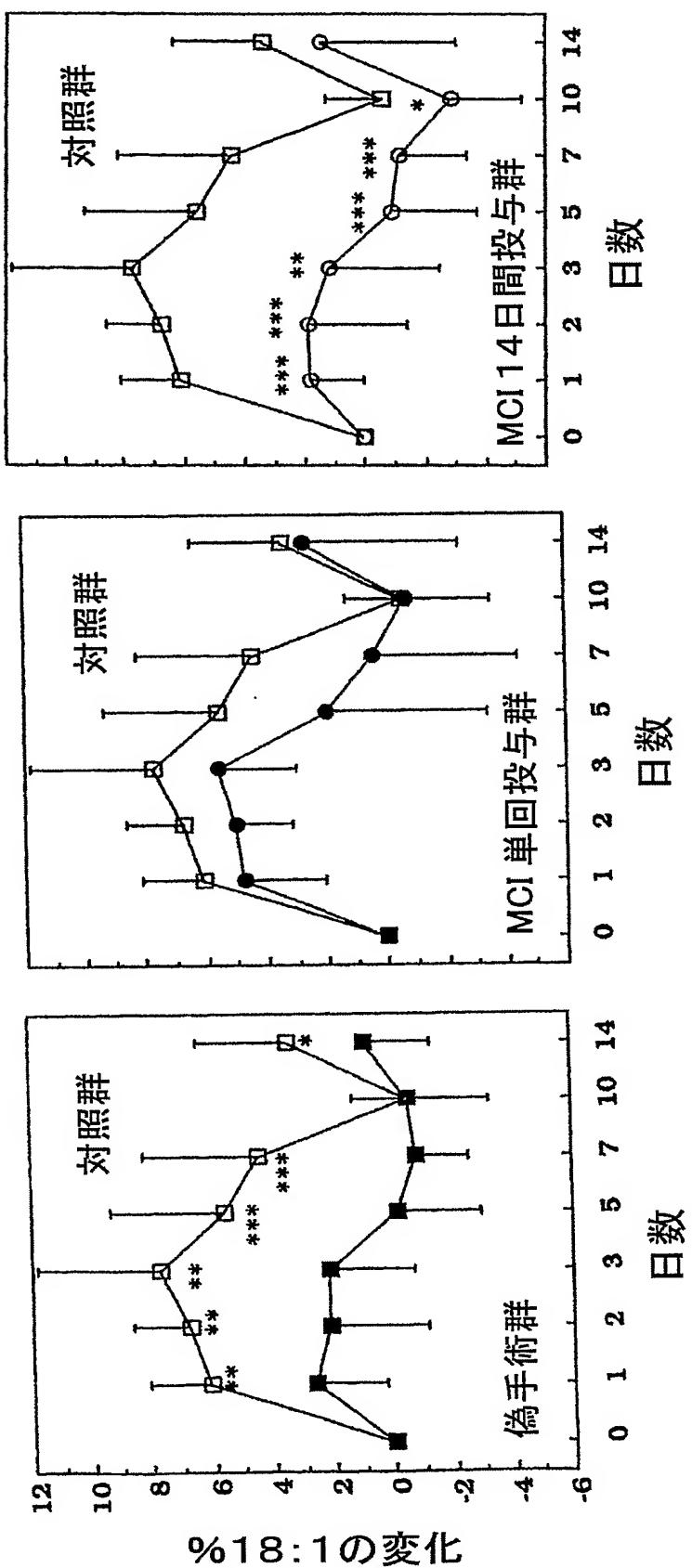
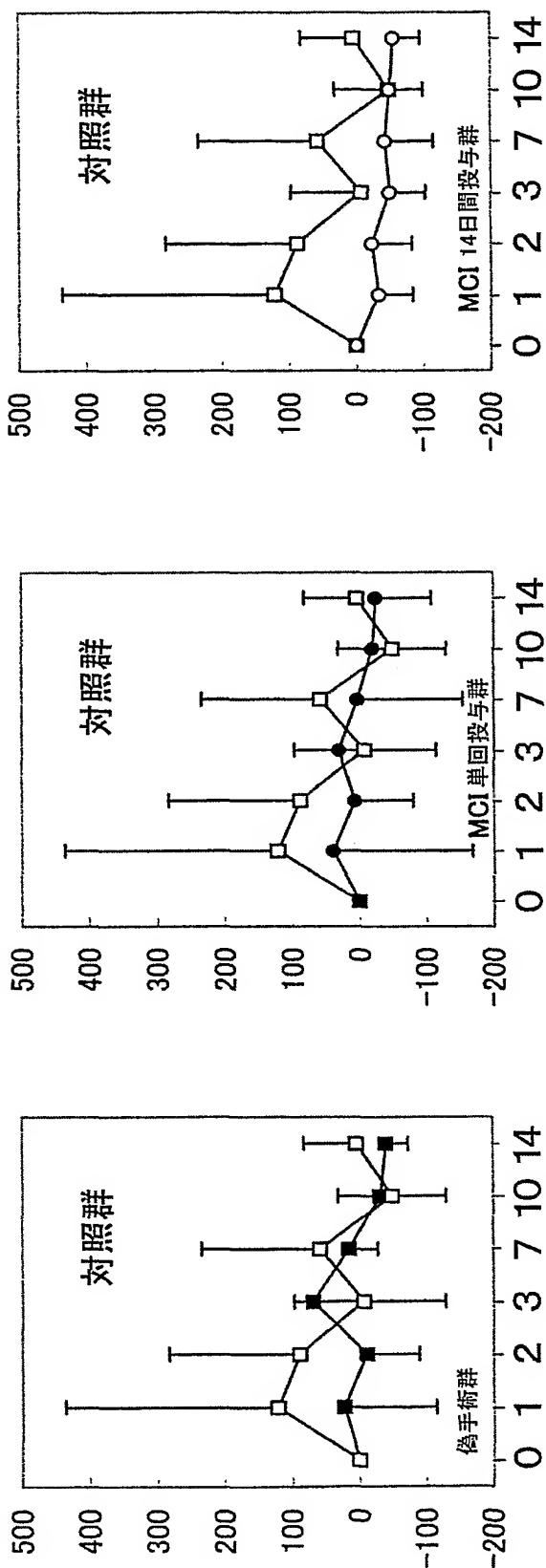
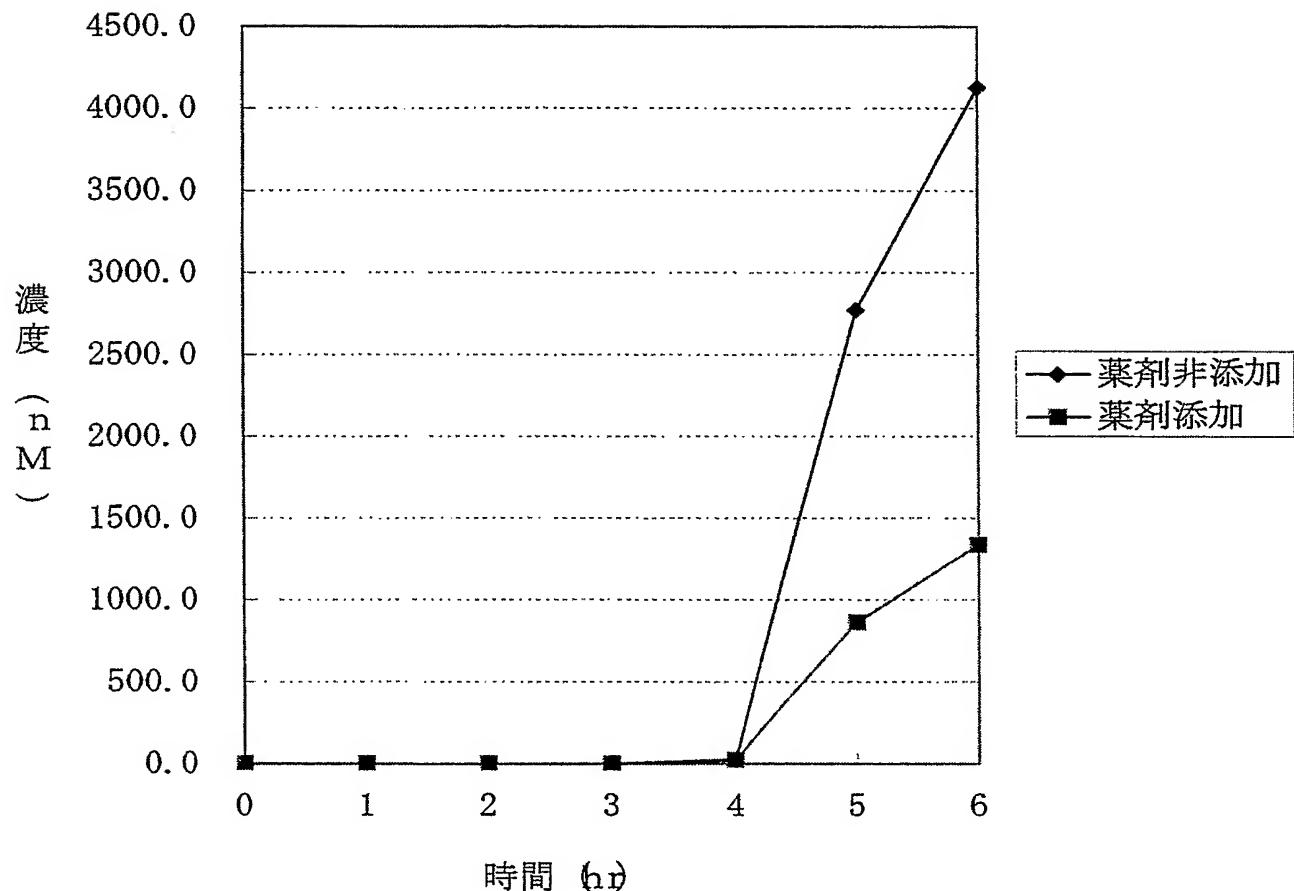


図 3



CoQ-10の変化

図 4



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2002年09月06日 (06.09.2002) 金曜日 10時33分16秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v))	本国際出願に關し、 三菱ウェルファーマ株式会社は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2001年09月07日 (07.09.2001)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	過酸化脂質研究 第25巻
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/4152, A61P1/16, 3/10, 7/04, 9/00, 43/00,
G01N33/48, C07D231/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K, A61P, C07D, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPIL (QUESTEL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-108814 A (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), 20 May, 1987 (20.05.87), Claims; examples (Family: none)	1-6, 12-16
Y	EP 633025 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 11 January, 1995 (11.01.95), Full text; particularly, Claim 2 & JP 7-26765 A & US 5837723 A & CA 2127519 A1	1-6, 12-16
Y	JP 3-215425 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 21 September, 1991 (21.09.91), Claims; page 1, right column, lines 5 to 9; page 2, upper left column, line 7 to upper right column, line 17 (Family: none)	1-6, 12-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 December, 2002 (09.12.02)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09087

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 249735 A2 (A. Nattermann & Cle. GmbH), 05 May, 1987 (05.05.87), Page 2, lines 13 to 35; page 5, lines 19 to 21; page 6, lines 1 to 5 & JP 62-294613 A Page 1, right column, line 6 to page 2, upper left column, line 14; page 4, upper left column, line 18 to upper right column, line 2 & DE 3616923 A	1-6, 12-16
Y	WO 99/64424 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 16 December, 1999 (16.12.99), Page 16, lines 4 to 13 & EP 1086952 A1 Page 9, Par. No. [0067] & AU 4060699 B & CA 2334249 A1	1-6, 12-16
X	WO 99/63341 A1 (Nikken Foods Co., Ltd.), 09 December, 1999 (09.12.99), Page 12; Nos. 38, 39 & EP 1032833 A2 Page 12; Nos. 38, 39 & AU 7455698 B & JP 2002-517724 A	7-11
Y		12-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09087

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1 EP 249735 A2 (A. Nattermann & Cle. GmbH) 1987.05.05
Document 2 WO 99/63341 A1 (NIKKEN FOODS Co., Ltd.) 1999.12.09

The inventions as set forth in claims 1 to 16 of the present case have a common technical feature relating to oxidation stress. However, there had been known an invention relating to an oxidation stress agent and an invention relating to a method of measuring oxidation stress, as reported in Documents 1 and 2. Thus, it cannot be considered that the technical feature relating to oxidation stress is a technical feature that defines a contribution over the prior art. (Continued to extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09087

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Such being the case, it cannot be recognized that the inventions relating to oxidation stress agents as set forth in claim 1 to 6, the inventions relating to methods of evaluating the efficacy of the oxidation stress inhibitory effect in case of administering a certain drug as set forth in claims 12 to 14 and the inventions relating to drugs as set forth in claims 15 and 16, and the inventions relating to methods of measuring stress as set forth in claims 7 to 9, the invention relating to a clinical examination method as set forth in claim 10 and the invention relating to a method of evaluating the efficacy of oxidation stress as set forth in claim 11 form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL' A61K 31/4152, A61P 1/16, 3/10, 7/04, 9/00, 43/00, G01N 33/48, C07D 231/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL' A61K, A61P, C07D, G01N 33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), WPIL(QUESTEL)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP62-108814 A (三菱化成工業株式会社) 1987.05.20 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-6, 12-16
Y	EP 633025 A1 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 1995.01.11 文献全体, 特に請求項 2 & JP 7-26765 A & US 5837723 A & CA 2127519 A1	1-6, 12-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.12.02

国際調査報告の発送日

24.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

岡崎 美穂

4C 9166



電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 3-215425 A (三菱化成株式会社) 1991.09.21 特許請求の範囲、第1頁右欄第5~9行、第2頁左上欄第7行~右上欄第17行 (ファミリーなし)	1-6, 12-16
Y	EP 249735 A2 (A. Nattermann & Cle. GmbH) 1987.05.05 第2頁第13~35行、第5頁19~21行、第6頁1~5行 & JP62-294613 A (第1頁右欄第6行~第2頁左上欄第14行、第4頁左上欄第18行~右上欄第2行) & DE 3616923 A	1-6, 12-16
Y	WO 99/64424 A1 (TAKARA SHUZO Co., Ltd) 1999.12.16 第16頁第4~13行 & EP 1086952 A1 (第9頁[0067]) & AU 4060699 B & CA 2334249 A1	1-6, 12-16
X Y	WO 99/63341 A1 (NIKKEN FOODS Co., Ltd) 1999.12.09 第12頁No. 38, 39 & EP 1032833 A2 (第12頁No38, 39) & AU 7455698 B & JP 2002-517724 A	7-11 12-14

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献1 EP 249735 A2 (A. Nattermann & Cle. GmbH) 1987.05.05
 文献2 WO 99/63341 A1 (NIKKEN FOODS Co., Ltd) 1999.12.09

本願の請求の範囲1—16に係る発明は、酸化ストレスとの技術的特徴が共通しているが、酸化ストレス剤の発明及び酸化ストレスを測定する方法の発明は文献1、2に記載されているようにそれぞれ公知であり、酸化ストレスとの技術的特徴が先行技術に対して貢献する技術的特徴であるとは認めることはできない。

(特別ページに続く)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

(第II欄の続き)

よって、本願の請求の範囲1－6に係る酸化ストレス剤の発明、請求の範囲12－14に係る特定の薬剤を投与した場合の酸化ストレス抑制作用の有効性を評価する方法の発明、請求の範囲15－16に係る医薬の発明に対して、請求の範囲7－9に係るストレス測定方法の発明、請求の範囲10に係る臨床検査法の発明、請求の範囲11に係る酸化ストレスの有効性を評価する方法の発明が、单一の一般的発明概念を構成しているとは認めることはできない。